

- alveolar ridge distraction osteogenesis // Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 2002. Vol. 17., № 4. P. 846-853.
12. *Pearce A.I., Richards R., Milz S., Schneider E.* Animal models for implant biomaterial research in bone // Europ. Cells and Materials. 2007. Vol. 13. P. 1-10.
13. *Pellegrini G., Seol Y.G., Gruber R., Giannobili W.V.* Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies // J. Dent. Res. 2009. Vol. 88. P. 1065-1076.
14. *Raab D.M., Crenshaw T.D., Kimmel D.B., Smith E.L.* A histomorphometric study of cortical bone activity during increased weight-bearing exercise // J. Bone Miner. Res. 1991. Vol. 6. № 4. P. 741-749.
15. *Schimandle J.H., Boden S.D.* Spine update. The use of animal models to study spinal fusion // Spine. 1994. Vol. 19. P. 1998-2006.
16. *Swindle M.M., Smith A.C., Hepburn B.J.* Swine as models in experimental surgery // J. Invest. Surg. 1988. №1 P. 65-79.
17. *Thorwarth M., Schultze-Mosgau S., Kessler P., Wiltfang J., Schlegel K.A.* Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite // J. Oral Maxillofac. Surg. 2005. Vol. 63. P. 1626-1633.
18. *Tumbleson M.E., Schook L.B.* Advances in swine biomedical research. New York, 1996. C. 1-19.
19. *Voigt J., Borysiewicz L.* Uniting research into human and animal health // Vet. Rec. 2010. Vol. 166. № 13. P. 406-407.
20. *Wang X., Mabrey J.D., Agrawal C.M.* An interspecies comparison of bone fracture properties // Biomed. Mater. Eng. 1993. Vol. 8. P. 1-9.
21. *Wikesjo U.M., Selvig K.A., Zimmerman G., Nilveus R.* Periodontal repair in dogs: healing in experimentally created chronic periodontal defects // J. Periodontol. 1991. Vol. 62. P. 258-263.
22. *Wikesjo U.M., Sigurdsson T.J., Lee M.B., Tatakis D.N., Selvig K.A.* Dynamics of wound healing in periodontal regenerative therapy // J. Calif. Dent. Assoc. 1995. Vol. 23. P. 30-35.

Planning of preclinical researches in implantology on mini-pigs

A.A. Kulakov, V.A. Badalyan, G.D. Kapanadze

To determine the processes of healing and osteointegration, after implant bed preparation with traditional burs in compare with piezosurgical tips were done on the 8 mini-pigs in experiment. The follow-up was 1, 30, 90 and 180 days. Radiological, histological, histomorphometric study were performed. In group with piezosurgical tips showed accelerating the integration and optimization of the wound healing processes.

Key words: implants, mini-pigs, surgical technique, traditional implant bed preparation, piezosurgery, osteointegration.

Влияние биомеханических свойств корнеосклеральной капсулы глаза на гидродинамику внутриглазной жидкости

Е.Н. Иомдина¹, О.А. Киселева¹, Л.А. Назаренко¹, Н.Ю. Игнатьева², В.Н. Баграташвили³

¹ – ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздравсоцразвития, Москва

² – МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

³ – ФГБУН Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк

Контактная информация: д.б.н. Иомдина Елена Наумовна iomdina@gmail.com

Предполагают, что нарушение биомеханических свойств склеры в области диска зрительного нерва и корнеосклеральной оболочки глаза в целом может играть существенную роль в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ). Цель работы: экспериментальное изучение влияния биомеханических свойств склеры на состояние гидродинамики внутриглазной жидкости (ВЖ). Для этого определяли механические характеристики и уровень поперечных сшивок коллагена склеры, а также гидродинамические показатели 1) интактных глаз молодых (2-х-месячных) и старых (2-х-летних) кроликов; 2) глаз, подвергнутых *in vivo* воздействию треозы, повышающей поперечную связанность коллагена; 3) глаз молодых и старых кроликов, а также кроликов, подвергнутых *in vivo* воздействию треозы, после воздействия *in vivo* протеолитическим ферментом (коллагелином). Гидродинамические показатели оценивали с помощью Глаутест 60. Для определения уровня поперечной связанности коллагена склеры использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Биомеханические показатели склеры оценивали с помощью Autograph AGS-H. Показано, что нормальное возрастное увеличение жесткости (модуля упругости) склеры с $23,1 \pm 4,2$ МПа до $41,4 \pm 6,3$ МПа сопровождается умеренным ростом поперечных сшивок и незначительным снижением оттока ВЖ. В то же время повышение жесткости склеры (до $65,4 \pm 6,0$ МПа), вызванное воздействием треозы, т.е. патологическим ростом уровня поперечной связанности, сопровождается небольшим повышением внутриглазного давления и значимым ухудшением оттока ВЖ. Под воздействием коллагелина у старых животных снизилась жесткость склеры (до $27,9 \pm 4,9$ МПа) и улучшилась гидродинамика ВЖ, соответствующие показатели у молодых животных изменились незначительно. Жесткость склеры, обработанной треозой и содержащей избыточные поперечные сшивки, также снизилась под воздействием коллагелина (до $43,4 \pm 4,5$ МПа), при этом улучшилась гидродинамика ВЖ. Очевидно, биомеханические свойства склеры оказывают влияние на гидродинамику глаза: при повышении жесткости склеры за счет избыточного формирования поперечных связей в ее коллагеновых структурах отток ВЖ снижается, что может быть фактором развития ПОУГ. Протеолитическая терапия с помощью коллагелина дает возможность снизить число таких сшивок, уменьшить жесткость склеры и улучшить гидродинамические показатели глаза.

Ключевые слова: склера, внутриглазная жидкость, коллаген, поперечные связи, модуль упругости, глаукома.

Введение

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – многофакторное заболевание глаза, характеризующееся повышением внутриглазного давления (ВГД), прогрес-

сирующей атрофией зрительного нерва и сужением поля зрения, приводящее к необратимой утрате зрительных функций [12, 13]. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последние годы в лече-

нии этого тяжелого заболевания, частота ПОУГ растёт: по оценке ВОЗ в 2010 г. численность больных глаукомой составляла около 60 млн, а к 2020 г. она вырастет почти до 80 млн человек [26]. Именно поэтому по-прежнему актуальным является изучение патогенеза глаукомного поражения и разработка эффективных мер его профилактики и лечения.

Согласно современным представлениям, нарушение биомеханических свойств склеры в области решетчатой пластины и диска зрительного нерва, трабекулярной ткани и всей корнеосклеральной оболочки глаза в целом может играть существенную роль в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы [4, 10, 11, 16, 19, 27].

Полученные различными исследователями данные свидетельствуют о наличии тесной связи между биомеханическими свойствами трабекулярной ткани, решетчатой пластины и собственно склеры, а также об изменении свойств этих структур при развитии глаукомного процесса [18, 19, 21].

В работе [15] с использованием метода динамической ригидометрии установлено возрастание ригидности склеральной ткани при ПОУГ уже в самом начале заболевания, которое значительно превышало возрастные изменения этого показателя. Определение амплитуды глазного пульса и пульса глазного дна методом пневмотонометрии и лазерной интерферометрии позволило выявить повышенную жесткость структур глаза, в том числе склеры, у пациентов с различными стадиями ПОУГ при медикаментозно компенсированном ВГД [22]. Обследование больных с ПОУГ с помощью анализатора глазного ответа (ORA, Reichert) показало закономерное снижение корнеального гистерезиса (КГ), т.е.

повышение жесткости роговицы, по мере прогрессирования глаукомного поражения (сравнение показателей проводилось также при компенсированном ВГД) [2, 9]. При асимметрии глаукомного процесса КГ оказывается ниже на худшем глазу [17]. Данный показатель, по всей видимости, отражает биомеханические свойства не только роговицы, но и корнеосклеральной капсулы глаза в целом [10, 14]. Это подтверждается прямыми измерениями податливости передне-экваториального отдела склеры глаукомных глаз с помощью тонометра Шиотца, которые показали повышение жесткости склеры по мере развития ПОУГ [28]. Наконец, о повышенной при глаукоме жесткости склеры неопровержимо свидетельствует ее более высокая, чем в норме, акустическая плотность [1], повышенное содержание в ее коллагеновых структурах стабилизирующих внутри- и межмолекулярных поперечных сшивок, а также более высокая концентрация нерастворимого коллагена, коррелирующая со стадией глаукомного процесса [2, 8]. Увеличение жесткости и плотности соединительнотканной оболочки глаза при ПОУГ сопровождается соответствующими изменениями и трабекулярной зоны. Методом атомной силовой микроскопии показано резкое увеличение модуля упругости трабекулы у пациентов с глаукомой [24].

Естественное старение приводит к 2-3-х-кратному утолщению корнеосклеральной трабекулы с соответствующим уменьшением площади фильтрации внутриглазной жидкости, а при развитии глаукомы, даже на ранних ее стадиях, патологическая ригидность корнеосклеральной капсулы, в целом, двукратно превышает ее инволюционные изменения [15, 16].

Повышенная плотность склеры, обусловленная, прежде всего, избыточным содержанием коллагена и поперечных сшивок в соединительнотканых структурах [8], приводит к снижению ее проницаемости, что препятствует транссклеральному движению жидкости [23], значительно увеличивает сопротивление оттоку водянистой влаги и снижает его интенсивность [25]. Таким образом, повышение плотности соединительнотканых структур глаза обуславливает снижение оттока водянистой влаги через естественные дренажные пути.

Однако остается неясным, является ли повышенная жесткость и плотность корнеосклеральной капсулы глаукомных глаз следствием глаукомного процесса или может быть одним из независимых риск-факторов его возникновения и развития. Для ответа на этот вопрос представляется целесообразным изучить связь между гидродинамикой глаза и биомеханическими свойствами корнеосклеральной оболочки.

Целью этой работы явилось экспериментальное изучение методом тонографии влияния биомеханических свойств склеры на состояние гидродинамики внутриглазной жидкости.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование, проведенное на 18 кроликах породы шиншилла, включало три основных этапа: 1) сравнительное изучение биомеханических показателей склеры и показателей гидродинамики глаз «молодых» (2-х-месячных) и «старых» (2-х-летних) intactных кроликов (1 группа); 2) оценка изменения биомеханических показателей склеры и показателей гидродинамики глаз кроликов в результате субтеноновых инъекций гликирующего

агента (раствора треозы), повышающего уровень поперечной связанности коллагена склеры (2 группа); 3) оценка изменения биомеханических показателей склеры и показателей гидродинамики глаз intactных кроликов и кроликов, получавших инъекции треозы, в результате субтеноновых инъекций протеолитического фермента коллалазина (3 группа).

Для обследования экспериментальных животных был применен комплекс специальных методов. Гидродинамические показатели оценивали методом тонографии (которая является практически единственной методикой, позволяющей неинвазивным способом *in vivo* оценить проницаемость соединительнотканых оболочек и гидродинамику внутриглазной жидкости) с помощью прибора Глаутест 60 (Россия). Определяли внутриглазное давление (P_0), коэффициент легкости оттока внутриглазной жидкости (C), уровень ее продукции (F), коэффициент Беккера (КБ) как отношение тонометрического давления к коэффициенту легкости оттока внутриглазной жидкости (P_0 / C).

Для определения уровня поперечной связанности коллагена склеры использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), позволяющий измерить термодинамические параметры денатурации коллагена (эндотермический температурный пик T_d и энтальпию ΔH_d). Возрастание температуры денатурации (T_d) принято связывать с увеличением степени сшивания коллагенового волокна [29, 31]. ДСК-термограммы получали с помощью термического анализатора модели Mettler TA 4000 с ячейкой DSC20. Образцы склеры массой 4-20 мг помещали в герметичный алюминиевый бокс и нагревали с 20 до 100°C со скоростью

сканирования 5°C/мин. Пустой бокс использовали для контроля. Энтальпию перехода рассчитывали на 1 грамм коллагена.

Для определения биомеханических показателей склеры – разрывной нагрузки P (Н), предела прочности σ (МПа), деформации ε (%) и модуля упругости E (МПа) – из нее специальным ножом с двумя режущими поверхностями вырезали стандартные образцы шириной 4,0 мм. После измерения их толщины на аппарате PosiTensor 6000 (DeFelsko, USA) проводили механические испытания на деформационной машине Autograph AGS-H, (SHIMADZU, Япония). Зависимость «напряжение-деформация», получаемая в процессе растяжения образца (скорость 1 мм/мин) вплоть до разрыва, непрерывно записывалась в цифровом и графическом режиме компьютерным блоком аппарата.

Результаты и их обсуждение

Сравнительное изучение биомеханических показателей склеры интактных 2-х-месячных и 2-х-летних кроликов (1 группа) выявило их существенные различия. Так, модуль упругости склеры молодых животных ($E=23,1\pm 4,2$ МПа) оказался в 1,8 раза ниже, чем старых ($E=41,4\pm 6,3$ МПа) ($p<0,01$). Ранее нами были подробно изучены упруго-прочностные показатели склеры глаз интактных 8-12-ти-месячных кроликов, которые служили контролем в экспериментах по укреплению склеры [6, 30]. По нашим данным, модуль упругости склеры кролика в этом возрастном периоде составляет $37,3\pm 8,4$ МПа. Сопоставление этих значений позволяет заключить, что модуль упругости склеры кролика закономерно повышается с возрастом.

Возрастное повышение жесткости склеры сопровождается увеличением уровня поперечных сшивок: температура денатурации (T_d) коллагена склеры старых животных составляет $69,5\pm 1,3^\circ\text{C}$, а для склеры молодых кроликов $T_d=67,7\pm 1,1^\circ\text{C}$ ($p<0,05$). Эти результаты полностью соответствуют известному по литературным данным возрастному увеличению модуля упругости и поперечной связанности других соединительнотканых образований организма – в частности, связок и сухожилий [20].

Измерение ВГД тонометром Маклакова (груз 10 г) не выявило значимых различий между старыми и молодыми кроликами. В то же время, сравнение гидродинамических показателей глаз кроликов в этой группе показало, что коэффициент легкости оттока у молодых животных ($C=0,19\pm 0,02$ мм³/мин/мм рт. ст.) несколько выше, чем у старых ($C=0,15\pm 0,01$ мм³/мин/мм рт.ст.). Тенденция к снижению с возрастом этого гидродинамического показателя происходит на фоне выявленного нами возрастного повышения жесткости склеры.

Во второй группе кроликов, где проводилась оценка воздействия повышенного уровня поперечной связанности склеры на ее биомеханические показатели и гидродинамику глаза, под тенонову капсулу правых (опытных) глаз инъецировали раствор известного гликирующего агента – треозы в концентрации 0,139 ммоль, левый глаз (контрольный) оставался интактным. Всего в течение 20 дней произвели 9 инъекций.

Биомеханические испытания, проведенные через 1 и 3 мес. после окончания курса инъекций треозы, показали значительные изменения упруго-прочностных показателей склеры опытных глаз по сравнению с контрольными (табл. 1).

Таблица 1

Воздействие инъекций треозы на биомеханические показатели склеры, уровень ее поперечной связанности и гидродинамику глаза

Срок наблюдения после курса инъекций	Показатель			
	Модуль упругости E , МПа	Температура денатурации T , °C	Коэффициент легкости оттока C , мм ³ /мин/мм рт. ст.	ВГД, мм рт. ст.
1 мес.	$57,5\pm 3,1^*$	$76,6\pm 1,6^*$	$0,12\pm 0,01^*$	$18,8\pm 0,7^*$
3 мес.	$65,4\pm 6,0^*$	$77,0\pm 1,5^*$	$0,13\pm 0,03^*$	$18,8\pm 0,9^*$
контроль	$27,2\pm 3,5$	$64,3\pm 1,4$	$0,20\pm 0,02$	$17,0\pm 0,4$

* – изменение по сравнению с контролем (интактной склерой) достоверно, $p<0,05$.

В опытных глазах через 1 мес. $E=57,5\pm 3,1$ МПа, через 3 мес. величина E оставалась практически на том же повышенном уровне ($E=65,4\pm 6,0$ МПа), в то время как в контроле этот показатель был, в среднем, в 2 раза ниже и составлял $E=37,3\pm 8,4$ МПа ($p<0,01$). В соответствии с ростом модуля упругости, значимо увеличился и уровень поперечных сшивок: эндотерма денатурации коллагена в склере после инъекций треозы представляет собой два пика с максимумами $68\pm 1^\circ\text{C}$ и $73,5\pm 1^\circ\text{C}$. Тепловой эффект процесса составляет $56,5\pm 2,7$ Дж на 1 г коллагена в ткани, что соответствует ΔH_d денатурации этого белка. В среднем, в опытных глазах $T_d=71,5\pm 2,5^\circ\text{C}$, а в контрольных $T_d=64,3\pm 1,4^\circ\text{C}$ ($p<0,01$).

Повышение жесткости склеры и уровня ее поперечной связанности отразилось на состоянии гидродинамики опытных глаз. Через 1 мес. после окончания курса инъекций треозы на опытных глазах $P_0=18,8\pm 0,7$ мм рт.ст. (на парном интактном глазу $17,0\pm 0,4$ мм рт.ст.), $C=0,12\pm 0,01$ мм³/мин/мм рт. ст. (на парном глазу $0,20\pm 0,02$ мм³/мин/мм рт. ст.), $KB=144\pm 5,0$ (на парном глазу $84\pm 6,0$). Значимое ($p<0,05$) ухудшение гидродинамических показателей внутриглазной

жидкости, развившееся после субтеноновых инъекций раствора треозы, сохранялось и через 3 мес. после окончания курса этих инъекций: $P_0=18,8\pm 2,0$ мм рт.ст., $C=0,13\pm 0,07$ мм³/мин/мм рт. ст., $KB=143,8\pm 18,1$.

На 3-м этапе эксперимента, посвященном оценке воздействия протеолитического фермента (коллагелиназы), исследовано изменение показателей как интактных животных (группа 3а), так и животных, предварительно получавших курс субтеноновых инъекций раствора треозы (группа 3б) (табл. 2).

В группе 3а у молодых животных курс из 10 субтеноновых инъекций коллагелиназы (150 ед.) в правый (опытный) глаз привел через 1 мес. после его окончания к небольшому статистически незначимому снижению модуля упругости ($E=19,3\pm 4,2$ МПа) по сравнению с левым (интактным) глазом ($E=23,1\pm 4,2$ МПа). В то же время эффект снижения жесткости склеры у старых животных был более значительным: на опытных глазах $E=27,9\pm 4,9$ МПа, а на парных интактных глазах этот показатель был, в среднем, на 32,6% выше: $E=41,4\pm 6,3$ МПа ($p<0,02$).

Снижение жесткости склеры старых животных под воздействием субтено-

Таблица 2

Воздействие протеолитического фермента (коллалазина) на биомеханические показатели склеры, уровень ее поперечной связанности и гидродинамику глаз, предварительно подвергнутых воздействию треозы

Показатель	Опыт: треоза+коллалазин	Контроль: треоза
Е, МПа	43,4±4,5*	65,4±4,9
Температура денатурации Т, °С	69,5±2,5*	76,6±1,6
Р ₀ , мм рт. ст.	15,0±0,7*	19,5±2,0
С, мм ³ /мин/мм рт. ст.	0,21±0,03*	0,14±0,04
КБ	86±22,0*	145,5±7,3

* – изменение по сравнению с контролем достоверно, $p < 0,05$.

новых инъекций коллалазина сопровождалось небольшим достоверным снижением ВГД – до $P_0 = 15,3 \pm 0,3$ мм рт. ст. и улучшением оттока – $C = 0,21 \pm 0,04$ мм³/мин/мм рт. ст. по сравнению с парным интактным глазом: $P_0 = 17,5 \pm 0,3$ мм рт. ст., $C = 0,15 \pm 0,01$ мм³/мин/мм рт. ст. ($p < 0,05$). При этом значения ВГД и С глаз молодых кроликов под воздействием инъекций коллалазина практически не изменились.

В группе 3б, где через 1 мес. после курса субтеноновых инъекций треозы в оба глаза провели 10 субтеноновых инъекций коллалазина в правые глаза (опытная группа), биомеханические испытания, выполненные через 1 мес. после окончания курса протеолитической терапии, выявили достоверное снижение жесткости склеры по сравнению с левыми глазами (контрольная группа, где был проведен только курс инъекций треозы). Модуль упругости склеры опытных глаз снизился до $43,4 \pm 4,5$ МПа и приблизился к среднему уровню нормы ($37,3 \pm 8,4$ МПа), в то время как величина Е у парных глаз после воздействия треозы оставалась высокой ($65,4 \pm 4,9$ МПа) ($p < 0,02$). В среднем, снижение жесткости склеры,

предварительно подвергнутой воздействию треозы, в результате протеолитической терапии составило 33,6%. При этом после действия коллагенолитического фермента эндотерма денатурации меняется – высокотемпературный пик исчезает или превращается в плечо, при этом температура денатурации основной фракции снижается. Важно, что тепловой эффект денатурации сохраняется $\Delta H_D = 58,8 \pm 3,3$.

Снижение жесткости склеры сопровождалось достоверным ($p < 0,05$) снижением величины ВГД и улучшением гидродинамических показателей: в опытной группе глаз P_0 составило $15,0 \pm 0,7$ мм рт. ст. (на парных глазах $P_0 = 19,5 \pm 2,0$ мм рт. ст.), $C = 0,21 \pm 0,06$ мм³/мин/мм рт. ст. (на парных глазах $C = 0,14 \pm 0,04$ мм³/мин/мм рт. ст.), КБ = $86 \pm 22,0$ (на парных глазах КБ = $145,5 \pm 7,3$).

Полученные нами экспериментальные данные, касающиеся модуля упругости склеры глаз кроликов и коэффициента легкости оттока внутриглазной жидкости, совместно с данными ДСК показывают, что при увеличении жесткости склеральной ткани происходит снижение оттока внутриглазной жид-

кости. При этом коллалазин способен снижать плотность склеральной ткани и, как следствие, повышать коэффициент легкости оттока, вероятно, за счет снижения уровня поперечных сшивок, полученных в результате гликации, возникающих, в том числе, в процессе естественного старения.

Известно, что у пациентов с ПОУГ происходит патологическое ускорение естественных геронтологических процессов изменения эластичности и упругости фиброзных оболочек глаза [3]. Возможно, укрепление тканевого матрикса глаукомной склеры в большей степени вызвано усилением процессов сшивания трансклутаминой ферментом, активация которого является проявлением апоптоза [29], и ослаблением действия коллагенолитических ферментов. В результате скорость деградации тканевых структур снижается по сравнению со скоростью синтеза.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) позволяет получить эндотерму денатурации коллагена, представленную четким пиком, отражающим конформационный переход спираль-клубок и более или менее выраженным высокотемпературным плечом, показывающим наличие фракции коллагена, сшитой поперечными связями по механизму неферментативной гликации, которые формируются во время старения (плечо не выражено у пациентов моложе 15 лет) [6, 7]. Воздействие треозы приводит к возрастанию уровня поперечных сшивок коллагена, полученных в результате гликации, об этом свидетельствуют данные ДСК. Результаты ДСК склеры кроликов, предварительно подвергнутой воздействию треозы, после инъекций коллалазина свидетельствуют о том, что макромолекулы коллагена сохраняют на-

тивную трехспиральную конформацию. Снижение основного пика денатурации и исчезновение высокотемпературного плеча однозначно указывает на уменьшение стабилизирующих сшивок, особенно образовавшихся в результате гликации. Возможно, преимущественный протеолиз гликированного коллагена связан с искажением квазикристаллической фибриллярной упаковки коллагена при гликации. Это приводит к облегчению образования фермент-субстратного комплекса и к последующей деградации гликированной фракции.

В настоящее время при лечении пациентов с ПОУГ для компенсации ВГД широкое распространение получили аналоги простагландинов. Усиление увеосклерального оттока при лечении простагландинами связано с разрежением тканевого матрикса ресничной мышцы [23]. Взаимодействуя со специфическими рецепторами, простагландины F2a вызывают усиление секреции металлопротеиназ (ММП) в тканях цилиарной мышцы. ММП могут разрушать фибриллы коллагена, в результате чего происходит разрежение матрикса. Это способствует уменьшению гидравлической резистентности путей увеосклерального оттока и снижению ВГД. Кроме того, в эксперименте показано, что перфузия трабекулярной зоны металлопротеиназами в десятки раз снижает сопротивление оттоку внутриглазной жидкости [25].

В проведенной нами работе экспериментально доказано, что коллалазин (коллагеназа, полученная из *Clostridium histolyticum*) способен снижать плотность и разрезать матрикс склеральной ткани, подвергнутой процессам естественного старения и гликации. В связи с этим, мы считаем целесообразным в дальнейшем клинически изучить возможность воз-

действия на соединительнотканную капсулу глаза пациентов с ПОУГ протеолитическими ферментами (коллагеназами) для снижения жесткости и увеличения ее проницаемости с целью профилактики развития глаукомного поражения.

Выводы.

Полученные экспериментальные результаты показывают, что биомеханические свойства склеры оказывают влияние на гидродинамику глаза: при повышении жесткости склеры за счет избыточного формирования поперечных связей (сшивок) в ее коллагеновых структурах отток внутриглазной жидкости снижается, что может быть риск-фактором развития ПОУГ. Протеолитическая терапия с помощью коллалазина дает возможность снизить число таких сшивок, уменьшить жесткость склеры и улучшить гидродинамические показатели глаза. Таким образом, ферментативная регуляция биомеханических свойств склеры (снижение ее жесткости), по всей видимости, является новым перспективным направлением в терапии глаукомного поражения.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 12-02-00622-а).

Список литературы

1. **Акопян А.И., Еричев В.П., Иомдина Е.Н.** Ценность биомеханических параметров глаза в трактовке развития глаукомы, миопии и сочетанной патологии // Глаукома. 2008. № 1. С. 9-14.
2. **Арутюнян Л.Л.** Роль вязко-эластических свойств глаза в определении давления цели и оценке развития глаукоматозного процесса // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 2009. 24 с.
3. **Вит В.В.** Строение зрительной системы человека. М. 2003. 727 с.

4. **Волков В.В.** Глаукома открытоугольная. М. 2008. 348 с.
5. **Данилов Н.А.** Состояние коллагена в тканях глаза и его целенаправленная модификация // Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М. 2011. 24 с.
6. **Данилов Н.А., Игнатъева Н.Ю., Иомдина Е.Н., Гроховская Т.Е., Обрезкова М.В., Руденская Г.Н., Лукин В.В.** Увеличение стабильности склерального коллагена в в ходе гликозилирования трезой *in vitro* // Журнал физ. химии. 2010. т. 84. № 1. С. 131-137.
7. **Игнатъева Н.Ю.** Термическая стабильность коллагена в соединительных тканях // Автореф. дис. ... докт. хим. наук. М. 2011. 51 с.
8. **Иомдина Е.Н., Арутюнян Л.Л., Игнатъева Н.Ю. и др.** Структурно-биомеханические особенности склеры у больных с разными стадиями ПОУГ // Сб. конф. «Рос. общенациональный офтальмол. форум». М. 2008. С. 540-544.
9. **Иомдина Е.Н., Арутюнян Л.Л., Катаргина Л.А. и др.** Взаимосвязь корнеального гистерезиса и структурно-функциональных параметров зрительно-открытоугольной глаукомы // Рос. офтальмол. журн. 2009. № 3. С. 17-23.
10. **Иомдина Е.Н., Игнатъева Н.Ю., Данилов Н.А. и др.** Биомеханика корнеосклеральной оболочки глаза при миопии и глаукоме: сходство и различия // «Биомеханика глаза 2009». М. 2009. С. 110-114.
11. **Кошиц И.Н., Светлова О.В., Котляр К.Е. и др.** Биомеханический анализ традиционных и современных представлений о патогенезе первичной открытоугольной глаукомы // Глаукома. 2005. № 1. С. 41-62.
12. **Нестеров А.П.** Глаукома: основные проблемы, новые возможности //

Вестн. офтальмол. 2008. № 1. С. 3-5.

13. Офтальмология: национальное руководство / под ред. С.Э.Аветисова, Е.А. Егорова, Л.К. Мошетовой, В.В. Нероева, Х.П. Тахчиди. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2011. 944 с.
14. **Светлова О.В., Балашевич Л.И., Засеева М.В. и др.** Физиологическая роль ригидности склеры в формировании уровня внутриглазного давления в норме и при глаукоме // Глаукома. 2010. № 1. С. 26-40.
15. **Страхов В.В., Алексеев В.В.** Динамическая ригидометрия // Вестн. офтальмол. 1995. Т. 111. № 1. С. 18-20.
16. **Страхов В.В., Алексеев В.В.** Патогенез первичной глаукомы - все или ничего // Глаукома. 2009. № 2. С. 40-52.
17. **Anand A., De Moraes C., Teng C. et al.** Hysteresis and Visual Field Asymmetry in Open Angle Glaucoma // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010. V. 51. N. 12. P. 6514-6518.
18. **Burgoyne C.F., Downs J.C., Bellezza A.J. et al.** The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage // Prog Retin Eye Res. 2005. V. 24. P. 39-73.
19. **Ethier C.R.** Scleral biomechanics and glaucoma - a connection? // Can J Ophthalmol. 2006. V. 41. P. 9-12.
20. **Fratzl P.** Collagen. Structure and mechanics. Potsdam. Springer. 2008. 506 p.
21. **Gottanka J., Johnson D.** Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork // J. Glaucoma. 1997. V. 6. P. 123-132.
22. **Hommer A., Fuchsjaeger-Mayrl G., Resch H. et al.** Estimation of Ocular Rigidity Based on Measurement of Pulse

Amplitude Using Pneumotonometry and Fundus Pulse Using Laser Interferometry in Glaucoma // IOVS. 2008. V. 49. P. 4046-4050.

23. **Kim J., Lindsey J., Wang N.** Increased Human Scleral Permeability with Prostaglandin Exposure // IOVS. 2001. V. 42. N 7. P. 1514-1521.
24. **Last J., Pan T., Ding Y.** Elastic Modulus Determination of Normal and Glaucomatous Human Trabecular Meshwork // IOVS. 2011. P. 10-6342
25. **Lindsey J.D., Kashivagi K., Kashivagi F., Weinreb R.N.** Prostaglandin action on ciliary smooth muscle extracellular matrix metabolism: implication for uveoscleral outflow // Surv Ophthalmol. 1997. V. 41. (suppl 2). P. 53-59.
26. **Quigley H. A., Broman A.T.** The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 // Br. J. Ophthalmol. 2006. Vol. 90. № 3. P. 262-267.
27. **Sigal I.A., Flanagan J.G., Ethier C.R.** Factors influencing optic nerve head biomechanics. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005. V. 46. P. 4189-4199.
28. **Sullivan-Mee M., Pensyl D., Halverson K. et al.** Rigidity in Primary Open-Angle Glaucoma // ARVO 2010, Suppl. E. Poster 5548.
29. **Wodzinska J. M.** // Mini Rev. Med. Chem. 2005. V. 5. P. 279-292.
30. **Wollensak G., Iomdina E.** Long-term biomechanical properties after collagen crosslinking of sclera using glyceraldehyde // Acta Ophthalmol. Scand. 2008. Vol. 86. Issue 8. P. 887-893.
31. **Zeeman R.** Cross-linking of collagen-based materials. Thesis University of Twente, Enschede, The Netherlands. 1998.

The impact of biomechanical properties of the corneoscleral shell on eye hydrodynamics (an experimental study)

E.N. Iomdina, O.A. Kiseleva, L.A. Nazarenko, N.Yu. Ignatieva,
V.N. Bagratashvili

It is hypothesized that impaired biomechanical properties of the sclera around the optic disc and, largely, in the corneoscleral shell may play an essential role in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma (POAG). The paper's objective is to study experimentally the impact of elastic scleral properties on intraocular fluid (IF) outflow. We determined the mechanical characteristics and the crosslinking level of the sclera as well as hydrodynamic parameters in three groups of experimental animals: 1) intact eyes of young (2 months of age) and old (2 years) rabbits; 2) eyes treated in vivo by threose, which increases crosslinking of scleral collagen; 3a) eyes of young and old rabbits after they were treated by collalysin, a proteolytic enzyme, 3b) eyes of rabbits pre-treated by treose and subsequently treated by collalysin. The hydrodynamic parameters were measured using Glautest 60. Differential scanning calorimetry was used to reveal the crosslinking level of scleral collagen. The biomechanical parameters of sclera were determined by Autograph AGS-H. The normal age-related increase of scleral stiffness (Young's modulus) from 23.1 ± 4.2 MPa to 41.4 ± 6.3 MPa ($p < 0.05$) is followed by a moderate growth of cross links and a somewhat reduced IF outflow. At the same time, an increase of scleral stiffness (to 65.4 ± 6.0 MPa) caused by threose, i.e. a pathological growth of crosslinking, is accompanied by a certain intraocular pressure increase and a significant impairment of IF outflow. Collalysin-treated old rabbits revealed a fall in scleral stiffness (to 27.9 ± 4.9 MPa) and an improved IF hydrodynamics, whereas young animals showed only a slight change in these parameters. The sclera treated by threose and containing excessive cross links also became less stiff (43.4 ± 4.5 MPa) and improved IF hydrodynamics after collalysin treatment. It may be assumed that the biomechanical properties of sclera affect the eye hydrodynamics: IF outflow is deteriorating with the increase of scleral stiffness that is caused by excessively generated cross links in its collagen structures, which may be a risk factor for POAG. Proteolytic therapy with collalysin helps reduce the amount of these links, make the sclera less stiff and improve hydrodynamic parameters of the eye.

Key words: sclera, intraocular fluid, collagen, crosslinking, elasticity modulus.

Изучение изотопных эффектов тяжелой воды (D_2O) в биологических системах на примере клеток прокариот и эукариот

О.В. Мосин¹, И. Игнатов²

¹ – Московский государственный университет пищевых производств, Москва

² – Научно-исследовательский центр медицинской биофизики НИЦ МБ, София, Болгария

Контактная информация: доктор наук Европейской академии естествознания
Игнатов Игнат mbioph@dir.bg

Изучены изотопные эффекты дейтерия (D) в клетках различных таксономических групп прокариотических и эукариотических микроорганизмов, реализующих метилотрофные, хемогетеротрофные, фотоорганогетеротрофные и фотосинтетические способы ассимиляции углеродных субстратов при росте на средах с тяжелой водой (D_2O). Разработан метод ступенчатой адаптации клеток к D_2O , заключающийся в их рассеве на чашках Петри с твердыми (2% агар) питательными средами при ступенчатом увеличении градиента концентрации D_2O (от 0 до 98% D_2O) и последующей селекции устойчивых к D_2O клеток. В результате этой техники на максимально дейтерированной среде с 98% D_2O получены адаптированные к D_2O клетки, биологический материал которых вместо атомов водорода содержит атомы дейтерия с уровнем дейтерированности молекул 92-97,5% D. Использование адаптированных к D_2O клеток и выделенных из них дейтерированных природных соединений (белки, аминокислоты, нуклеозиды, пигменты, углеводы, липиды) может найти дальнейшее применение в биофизических исследованиях и биомедицинских технологиях.

Ключевые слова: дейтерий, тяжелая вода, изотопные эффекты, адаптация, бактерии, микроводоросли.

Введение

Одним из интереснейших биологических феноменов является способность некоторых микроорганизмов расти в искусственных условиях в тяжелой воде (D_2O) [8]. D_2O обладает высоким экологическим потенциалом вследствие отсутствия радиоактивности, что способствует ее использованию в качестве изотопного индикатора в химии, биологии и медицине [18]. В природных водах соотношение D/H составляет 1:5500 (в предположении, что весь дейтерий находится в форме D_2O) [20]. В действительности дейтерий присутствует в форме D_2O лишь в концентрированных растворах. При небольших концентрациях в воде он

присутствует в форме HDO, поскольку в смесях D_2O - H_2O с большой скоростью происходят реакции диссоциации и изотопного (H-D) обмена, приводящие к образованию HDO.

Изотопные эффекты, опосредованные разницей нуклеарных масс дейтерия и протия пары H/D, могут быть достаточно большими [4]. Химические реакции в D_2O протекают с более медленной скоростью, чем в H_2O , D_2O слабее ионизирована, чем H_2O , константа диссоциации D_2O меньше таковой для H_2O , растворимость органических и неорганических веществ в D_2O , как правило, ниже, чем в H_2O , водородные связи с участием дейтерия несколько прочнее обычных, подвижность